

**На правах рукописи**

УДК: 577.1:616.831—009.11

Пахалина Ирина Анатольевна

**НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
ФОРМИРОВАНИЯ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА У  
БОЛЬНЫХ ДЕТСКИМ ЦЕРЕБРАЛЬНЫМ  
ПАРАЛИЧОМ**

03.00.04 — биохимия

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Казань – 2009**

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Валерий Васильевич Семенов**

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, доцент **Дина Дамировна Гайнетдинова**

**Официальные оппоненты:**

кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики Казанского государственного университета **Эдуард Викторович Бабынин**,  
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии Казанского ГМУ **Ильшат Ганиевич Мустафин**

**Ведущая организация** – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 г. в \_\_\_ часов на заседании Диссертационного Ученого совета Д.212.081.08 (420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского государственного университета

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
доктор биологических наук

З.И. Абрамова

7. Гайнетдинова Д.Д. Кластогенез и анеугенез у больных детским церебральным параличом / Д.Д. Гайнетдинова, В.В. Семенов, И.А. Пахалина и др. // Бюллетень эксперимент биологии и медицины. – 2005. – Т. 139, №5. – С. 557-561.

8. Гайнетдинова Д.Д. Исследование микроядер эритроцитов для оценки цитогенетических нарушений у больных детским церебральным параличом / Д.Д. Гайнетдинова, В.А. Якупова, С.А. Алюшева, И.А. Пахалина // Тезисы доклада XII Росс. Национ. Конгресса «Человек и лекарство». – М., 2005. – С. 85.

9. Gainetdinova D.D. Clastogenesis and Aneugenesis in Children with cerebral Palsy (article) / D.D. Gainetdinova, G.K. Ziyatdinova, V.V. Semenov, I.A. Pakhalina, E.V. Kolochkova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine (an Imprint of Springer) may 2005, vol. 139, №5, p. 596-599.

10. Гайнетдинова Д.Д. Генетический полиморфизм N-ацетилтрансферазы у больных детским церебральным параличом / Д.Д. Гайнетдинова, В.В. Семенов, И.А. Пахалина и др. // Казанский медицинский журнал. – 2006. – Т.87, №4. – С.261-264.

11. Гайнетдинова Д.Д. Генетический полиморфизм ацетилирования у больных детским церебральным параличом / Д.Д. Гайнетдинова, И.А. Пахалина // Материалы IX Всеросс. съезда неврологов. Ярославль, 2006. – С.169.

12. Абдуллатипова Д.В. Взаимосвязь клинических и цитогенетических нарушений при детском церебральном параличе / Д.В. Абдуллатипова, И.А. Пахалина, Д.Д. Гайнетдинова // Материалы Всеросс. научного конгресса «В.М.Бехтерев – основоположник нейронаук: творческое наследие, история и современность». – Казань, 2007. – С. 34.

13. Семенов В.В. Коррекция повреждений генома при патологических состояниях продуктами, обогащенными антимутагенами / В.В. Семенов, Е.С. Кошпаева, А.В. Семенов, Д.Д. Гайнетдинова, И.А. Пахалина // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2003, №3, С. 96.

5. Оценивая поведение системы ацетилирования в условиях нестабильности генома, было установлено, что у больных детским церебральным параличом преобладает медленный тип ацетилирования.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Пахалина И.А. Уровень эритроцитов с микроядерами в периферической крови детей больных церебральным параличом / И.А. Пахалина, Т.Б. Сибгатуллин // Материалы IX научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 190-летию Казанского медицинского университета. Казань, 2004 г. – С. 136-137.

2. Гайнетдинова Д.Д. Нестабильность генома у больных детским церебральным параличом / Д.Д. Гайнетдинова, М.Ф. Исмагилов, В.В. Семенов, И.А. Пахалина и др. // Казанский медицинский журнал. Казань. – 2004. – Т. 85, №4. – С. 263-268.

3. Гайнетдинова Д.Д. Исследование HLA-фенотипа у больных детским церебральным параличом / Д.Д. Гайнетдинова, М.Ф. Исмагилов, В.В. Семенов, И.А. Пахалина // Материалы III Российского конгресса по патофизиологии «Дезрегуляционная патология органов и систем». М., 2004. – С. 96-97.

4. Пахалина И.А. Микроядерный тест в оценке цитогенетических нарушений при детском церебральном параличе / И.А. Пахалина, Д.Д. Гайнетдинова, В.В. Семенов и др // Материалы конференции «Педиатрия в Приволжском федеральном округе», Нижегородский медицинский журнал «Здравоохранение приволжского федерал. Округа». – 2004. – Прил. – Ноябрь. – С. 162-163.

5. Гайнетдинова Д.Д. Исследование микроядер эритроцитов для оценки цитогенетических нарушений у больных детским церебральным параличом / Д.Д. Гайнетдинова, И.А. Пахалина, Д.В. Абдуллатипова // III Российский конгресс «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии», 26-28 окт. Москва. – М., 2004. – С. 142-143

6. Исмагилов М.Ф. Клинико-томографическое и иммуногенетическое исследование больных детским церебральным параличом / М.Ф. Исмагилов, Д.Д. Гайнетдинова, В.В. Семенов, И.А. Пахалина // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2005. – Т. 105, №2. – С. 55-58.

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Нестабильность генома (НГ) или генетическая нестабильность (ГН) – это постоянное изменение структуры хромосом, её отдельных локусов или группы локусов, возникающее спонтанно или под действием некоторых мутагенов. Признаком НГ является сохранение потенциальной возможности таких изменений в ряду клеточных поколений (Арефьев В.А., 1995). В общебиологическом смысле, феномен, повышая адаптационный потенциал живого, несомненно, является благоприятным свойством (Хесин Р.Б., 1984; Murnane J.P., 1996). Однако в медицинском аспекте НГ у больных может сопровождаться крайне нежелательными побочными эффектами. Одним из них является повреждение многочисленных локусов ДНК, в том числе и таких, где располагаются структурные и регуляторные гены. Последствия этого предсказуемы – нарушение экспрессии генов и стойкая дезинтеграция биохимического хозяйства клетки, что фенотипически проявится в утяжелении заболевания, пролонгации его течения, снижении эффективности терапевтических воздействий и, как следствие, ухудшение прогноза. Исходя из этого, в теории и практике медицины всё больший вес приобретают исследования механизмов определяющих возникновение и формирование НГ и разработки на их основе новых принципов диагностики, лечения и профилактики заболевания. Это в полной мере относится к детскому церебральному параличу, наличие в патогенезе которого аутоиммунных процессов, гипоксии и др. уже аргументированно предполагает возможность формирования нестабильности генома (Литвицкий П.Ф., 1997; Малышев И.Ю., 2000). ДЦП – гетерогенная группа клинических синдромов, возникающих в результате нарушения формирования головного мозга на ранних этапах онтогенеза (Бадалян Л.О., 1988; Виноградова Л.И., 2000; Семенова К.А. 1984, 2007; Grant A., 1992; Jarvis S.N., 1985). Нестабильность генома при этом заболевании совершенно не изучалась. Мировой опыт показывает (Барашнев Ю.И., 1991, 2001; Дурнев А.Д., 1998; Крыжановский Г.Н., 2002; Адо А.Д., 1980; Fuchs J., 1995; Williams C.E. 1993), что в таких случаях следует начать с доказательства наличия этого феномена и, в случае положительного результата, рассмотреть роль в его возникновении собственных метаболитов-мутагенов, биохимических процессов

генерирующих активные формы кислорода и стабильность систем защиты генома. Этот единый блок исследований, несмотря на ориентировочный характер, позволяет очертить контуры феномена и наметить точки для дальнейших исследований. И, наконец, важным моментом в исследовании является оценка функционирования самых различных биохимических процессов в условиях метаболической несостоятельности создаваемой НГ. В качестве такого процесса мы избрали одну из реакций биотрансформации – ацетилирование (Абилев С.К., 1986; Лакин К.М., 1981; Погорельцев В.И., 2003; Furet Y. 2002; Seifart H.I. 2001). Актуальность такого подхода очевидна – выявление новых элементов патогенеза заболевания расширяет возможности его лечения.

В заключении отметим, что установление феномена нестабильности генома при ДЦП, механизмов, приводящих к этой нестабильности, понимание её последствий может внести существенный вклад в представление об этиологии и патогенезе этого заболевания, послужить основой в разработке стратегических направлений в его лечении.

Всё вышеизложенное определило цель и задачи исследования.

**Цель работы:** определить наличие нестабильности генома у больных детским церебральным параличом, изучить вероятные механизмы ее формирования и оценить влияние на функционирование системы ацетилирования.

#### **Задачи исследования.**

1. Цитогенетическими методами показать наличие феномена нестабильности генома у детей больных ДЦП.
2. Оценить в опытах *in vitro* и *in vivo* мутагенную активность метаболитов этаноламина и фосфоэтанолламина.
3. Изучить в опытах *in vitro* способность этаноламина и фосфоэтанолламина модифицировать генерацию свободных радикалов в модельных химических и ферментативных системах (системы железиндуцированного окисления желточных липопротеинов, системы ксантиноксидазы и системы генерации монооксид азота).
4. В опытах *in vivo* у больных исследовать состояние интегральной антиоксидантной ёмкости крови и интенсивность процессов перекисного окисления липидов.
5. Определить характер реакции ацетилирования у больных в условиях выраженной нестабильности генома.

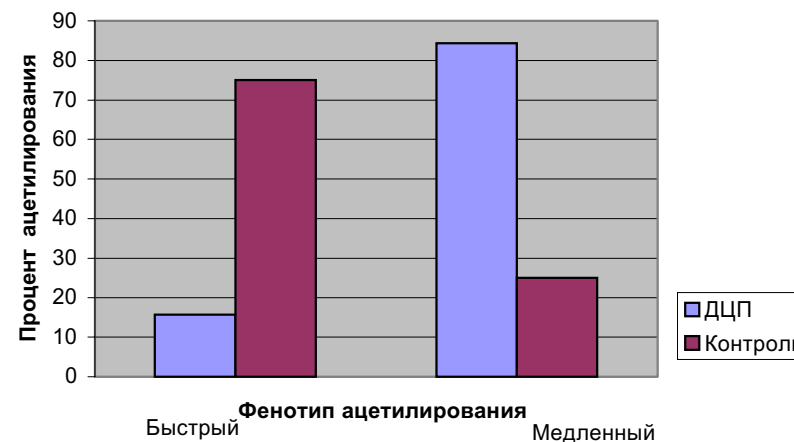


Рис.6. Сравнение быстрых и медленных фенотипов ацетилирования среди больных ДЦП и контролем.

ацетиляторным фенотипом более подвержен риску заболевания, чем индивид, унаследовавший быстрый фенотип ацетилирования.

#### **Выводы**

1. У больных детским церебральным параличом выявлен высокий уровень кластогенной и анеугенной изменчивости — повышается количество хромосомных aberrаций и эритроцитов с микроядрами в периферической крови.
2. В опытах *in vitro* и *in vivo* этаноламин и фосфоэтанолламин обладают способностью индуцировать процессы кластогенеза и анеугенеза. Этанолламин обладает большей активностью, чем фосфоэтанолламин.
3. В модельных ферментативных и химических системах в опытах *in vitro* этаноламин дозозависимо усиливает генерацию оксид азота и супероксид-анион радикала, фосфоэтанолламин такой способностью не обладает. Оба метаболита не повышают уровень липидной перекисации.
4. Содержание малонового диальдегида в плазме крови в большинстве случаев остается неизменным, а интегральная антиоксидантная емкость крови снижается.

расходовать на стабилизацию каких-то других внутриклеточных процессов, которые не связаны с повреждением генетического аппарата. Например, сохранение энергообеспечения клетки, работы  $\text{Ca}/\text{Na}$  – насоса и т.п.

На основании вышесказанного можно предположить, что патогенез заболевания ДЦП после рождения больного ребёнка может протекать по разным направлениям. Эта разница достигает такого уровня, что вполне возможно говорить не о формах заболевания ДЦП, а о различных нозологиях с характерным для каждой патогенезом. Вполне вероятно, что имея схожий генез в эмбриональном, перинатальном периодах по мере развития ДЦП, клинические проявления заболевания всё больше отдалялись друг от друга, превращаясь в различные неврологические формы. Такой своеобразный, дивергентный характер формирования ДЦП, скорее всего и породил не прекращающиеся дискуссии о месте этого заболевания в общей системе патологии. Тем не менее, мы отнюдь не призываем отказаться от современной классификации ДЦП предложенной К.А. Семёновой (Семенова КА., 1972) поскольку она не только снимает многие вопросы, но и позволяет формализовать ситуацию, что всегда необходимо на первых этапах углубленного изучения любого вопроса.

#### **4. Определение активности N-ацетилтрансферазы (N-AT)**

При определении активности N-AT было установлено, что среди детей, страдающих ДЦП, чаще встречаются лица с медленным типом ацетилирования (рис.6). При ДЦП они составили 84,3%, достоверно отличаясь от количества медленных ацетилаторов в группе контроля (25,0%;  $p < 0,01$ ). Среди здоровых лиц достоверно чаще встречались дети с быстрым типом ацетилирования (75,0%;  $p < 0,001$ ).

Сравнение частоты быстрых и медленных фенотипов среди больных ДЦП и среди здоровых лиц позволяет выявить связь между гено-фенотипом человека и его предрасположенностью к заболеванию. Для характеристики такой зависимости был вычислен коэффициент относительного риска (R).

Полученные результаты позволяют говорить, о том что у больных ДЦП преобладает медленный тип ацетилирования, а также подтвердить достоверную значимость риска предрасположенности к заболеванию индивидуумов с генетически детерминированным медленным ацетилаторным фенотипом (в 16,2 раза больше, чем быстрые ацетилаторы), так как  $R > 2,0$ . Вышесказанное предполагает, что индивид с медленным

#### **Научная новизна исследования.**

Впервые установлена мутагенная активность у метаболитов - этаноламина и фосфоэтанолламина. Высказано предположение об участии этих аминокислот в формировании нестабильности генома при ДЦП.

Выявлена способность этаноламина и фосфоэтанолламина усиливать генерацию в модельных радикал-генерирующих системах супероксида и оксид азота. Это предполагает наличие ещё одного пути формирования НГ – путём активации метаболитами (содержание которых повышается в крови при заболеваниях) биохимических систем генерирующих свободные радикалы. В тоже время исследуемые метаболиты не влияли на интенсивность функционирования модельной системы ПОЛ. Это наряду с отсутствием изменений в содержании МДА в сыворотки больных позволяет заключить, что система ПОЛ не является определяющей в формировании НГ при ДЦП. В общем плане это может быть отражением процесса дифференцированного участия систем генерации свободных радикалов в развитии НГ при различных заболеваниях.

Показана корреляция величины интегрального показателя антиоксидантной ёмкости крови со степенью выраженности НГ. Доказывается перспективность использования показателя интегральной антиоксидантной ёмкости крови (ИАЕК) в изучении НГ в качестве экспресс-метода.

Отмечена существенная модификация процесса ацетилирования у больных ДЦП по сравнению со здоровыми индивидуумами. Выдвинуты гипотезы объясняющие обнаруженный феномен.

#### **Практическая значимость исследования.**

Полученные данные о возможном участии в формировании НГ метаболитов-мутагенов и свободных радикалов ставит вопрос о необходимости разработки комплекса мероприятий обеспечивающих защиту генома от повреждений у больных ДЦП.

Выяснение причин модификации процесса ацетилирования у больных ДЦП позволит не только своевременно определить группы риска, но и поможет приступить к разработке принципов индивидуализированного лечения больных ДЦП.

Апробированный в наших исследованиях метод интегральной оценки антиоксидантной ёмкости крови в связи с простотой, экономичностью и высокой воспроизводимостью может использоваться как лабораторный метод экспресс-диагностики НГ.

### Основные положения, выносимые на защиту.

1. У больных детским церебральным параличом выявляется высокий уровень кластогенных и анеугенных повреждений генетического аппарата клеток периферической крови.

2. В опытах *in vitro* и *in vivo* метаболиты этаноламин и фосфоэтанолламин обнаружили способность индуцировать процессы анеугенеза и кластогенеза. Эта способность больше выражена у этаноламина.

3. В модельных (химических и ферментативных) системах *in vitro* этаноламин в отличие от фосфоэтанолламина усиливает генерацию супероксиданион радикала и оксид азота, уровень липидной пероксидации при воздействии обоих метаболитов остаётся без изменений. У больных на фоне снижения антиоксидантной защиты, уровень МДА в плазме крови (у большинства больных) не изменяется.

4. Среди больных с выраженной нестабильностью генома преобладают индивидуумы с фенотипом медленного ацетилирования.

### Внедрение результатов работы.

Результаты исследования антиоксидантной емкости крови используются в практической работе поликлиники Казанского научного центра РАН, а также при чтении лекций и проведения практических занятий на кафедре медицинской биологии и генетики и курсе медицинской генетики КГМУ.

### Апробация работы.

Основные результаты исследования были доложены на заседании кафедры медицинской биологии и генетики ГОУ ВПО «Казанский ГМУ» Росздрава от 8 апреля 2008 г.; на IX научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 190-летию Казанского медицинского университета (Казань, 2004); III конгрессе по патофизиологии с международным участием «Дизрегуляторная патология органов и систем» (Москва, 2004); фрагменты диссертации были доложены на постерной сессии молодых ученых научной конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии», посвященной 200-летию Казанского университета (Казань, 2004); научно-практической конференции «Педиатрия в Приволжском федеральном округе» (Казань, 2004), III Российском конгрессе «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 2004); международной конференции по проблемам

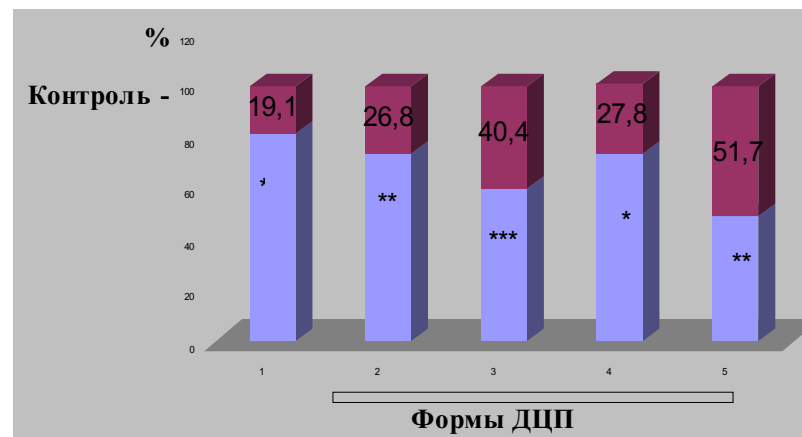


Рис. 5. Показатели интегральной антиоксидантной емкости крови больных ДЦП относительно контроля.

Примечание: 1. 1 – спастическая диплегия, 2 – двойная гемиплегия, 3 – гиперкинетическая форма, 4 – левосторонняя гемипаретическая, 5 – правосторонняя гемипаретическая; 2. \* – различие достоверно (\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ) в сравнении с группой контроля.

отличалась при разных формах заболевания. Этот достаточно большой разброс показателей, возможно связан с различной востребованностью антиоксидантной защиты при разных формах ДЦП. А поскольку предполагается, что уровень нестабильности генома взаимосвязан с активностью антиоксидантной защиты, то должна прослеживаться корреляция между уровнем повреждения хромосом и величинами снижения ИАЕК. При сравнении данных оказывается, что в порядке нарастания уровня перестроек хромосом больные с различными формами заболевания располагаются в следующей последовательности ДГ – ГП(Л) – ГК – СД – ГП(П), а в порядке уменьшения антиоксидантной ёмкости так: СД – ДГ – ГП(Л) – ГК – ГП(П). Сравнение приведённых последовательностей говорит об отсутствии какой-либо корреляции. Этот факт трудно объяснить. Однако повторимся, что это может быть связано с малой выборкой и по мере накопления фактического материала вопрос отпадёт. Не исключены и другие варианты. Например, вполне возможно, что функция системы антиоксидантной защиты связана не только с защитой генома от повреждения. Значительная часть ресурсов этой системы может

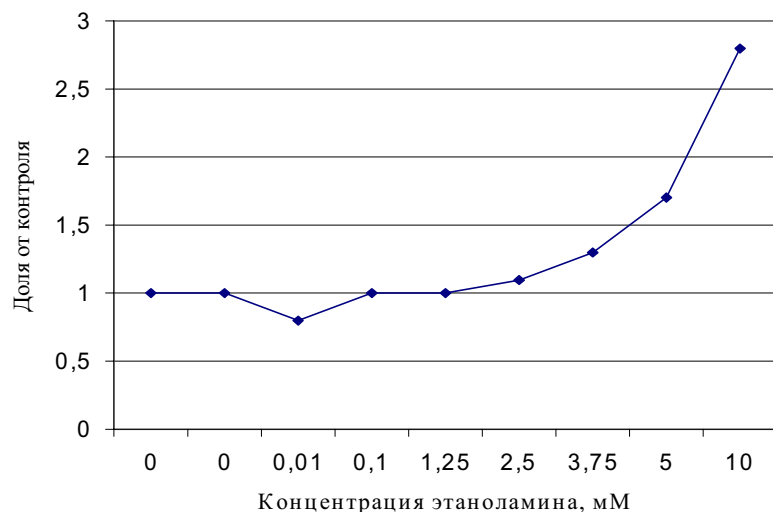


Рис. 4. Влияние этаноламина в зависимости от концентрации на образование NO в системе PTIO-SIN-1.

больного, наоборот МДА оказалось существенно ниже нормы. Такая разнонаправленность полученных результатов свидетельствует, с одной стороны, о том, что МДА не является основополагающим фактором в формировании НГ у детей со сформированной патологией. Однако, у нас нет оснований полностью отрицать её участие в формировании НГ в период развития ребенка. С другой стороны любые отклонения МДА от нормы реакции в сторону повышения или понижения свидетельствуют о наличии у части больных ДЦП каких-то дополнительных факторов избирательно поражающих систему ПОЛ. Это в свою очередь может быть косвенным подтверждением существующего мнения о разнообразии патогенетических механизмов заболевания.

### 3. Исследование антиоксидантного статуса методом кулонометрического определения интегральной антиоксидантной емкости крови

При исследовании антиоксидантного статуса у всех обследованных больных ДЦП независимо от формы заболевания интегральная антиоксидантная емкость крови (ИАЕК) оказалась достоверно ниже, чем у здоровых лиц (рис. 5). Следует отметить, что степень снижения ИАЕК

информатизации в третьем тысячелетии (Казань, 2004); XII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2005); IX Всероссийском съезде неврологов (Ярославль, 2006); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 150-летию В.М. Бехтерева «В.М. Бехтерев – основоположник нейронаук: творческое наследие, история и современность» (Казань, 2007).

#### Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 4 в рецензируемых журналах, 1 в международной печати.

#### Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из следующих глав: введения, обзора литературы, материалов и методов, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, указателя литературы, включающего 128 отечественных и 81 иностранных источника. Диссертация иллюстрирована 15 рисунками и 21 таблицей. Объем работы – 123 страницы. Работа выполнена на кафедре медицинской биологии и генетики Казанского государственного медицинского университета, на базе ЦНИЛа Казанского ГМУ, отделе молекулярной биологии РГМУ (Москва).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

**Материал исследования.** Для выполнения поставленных задач в исследованиях использовались кровь, моча больных ДЦП (144 чел.) и здоровых лиц (73 чел.) в возрасте от 1 года до 18 лет, кровь мыши, тест-объект *Crepis capillaries*, для экспериментальных исследований использовались препараты: этаноламин (Ethanalamine, 99%; Acros Organics, Бельгия), фосфоэтанолламин (2-aminoethyl dihydrogenphosphate, 95%; Acros Organics, Бельгия).

В экспериментальной части использовались лабораторные половозрелые мыши из питомника – Научный городок 2.

#### Методы исследования:

**Цитогенетический метод** (регистрация перестроек хромосом (Дубинина Л.Г., 2000; Бочков Н.П., 1984) и метод учета эритроцитов с микроядрами (Ильинский Н.Н., 1984).

### Биохимические методы:

а) спектрофотометрический метод (определение железиндуцированного окисления липопротеидов (Cerrutti P.A., 1985), активности N-ацетилтрансферазы (N-AT) (Евгеньев М.И. и соавт., 2004), интенсивности ПОЛ (Гончаренко М.С., 1985; Валеева И.Х., 1998);

б) хемилуминесцентный метод (супероксиддисмутазной (SOD)-активности);

в) электронно-парамагнитно-резонансный (ЭПР)-спектрометрический метод (влияние препаратов на образование монооксида азота (Deviatkina T.A. et al., 2000).

**Метод кулонометрического титрования** (определение интегральной антиоксидантной емкости крови (Абдуллин И.Ф. и соавт., 2002).

### Методы статистического анализа.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием непараметрического t-критерия Манна-Уитни. Для оценки достоверности различий в сравниваемых группах наблюдений применяли метод вариационной статистики с помощью t-критерия Стьюдента (Гланц С., 1998). Для выявления МДА использовался специальный критерий (Хартман, 1977). Для выбора доверительного интервала среднего значения полагали  $p < 0,05$ . Корреляционный анализ проводился по программе Origin 5.1.

### Результаты исследования и их обсуждение

Работа состояла из нескольких этапов. На первом этапе цитогенетическими методами определяли феномен нестабильности генома (НГ) у детей с ДЦП.

#### 1. Оценка содержания эритроцитов с микроядрами в крови больных и здоровых детей.

Результаты исследования показали значимое повышение уровня эритроцитов с микроядрами (ЭМ) в крови больных ДЦП, по сравнению со здоровыми детьми. Уровень ЭМ у больных детей как в группах с различными формами ДЦП, так и в группах разделенных по полу достоверно превышает (в группе в 10 раз, в 8 и 9 раз мальчики и девочки, соответственно) контрольные значения ( $p < 0,001$ ) (табл. 1).

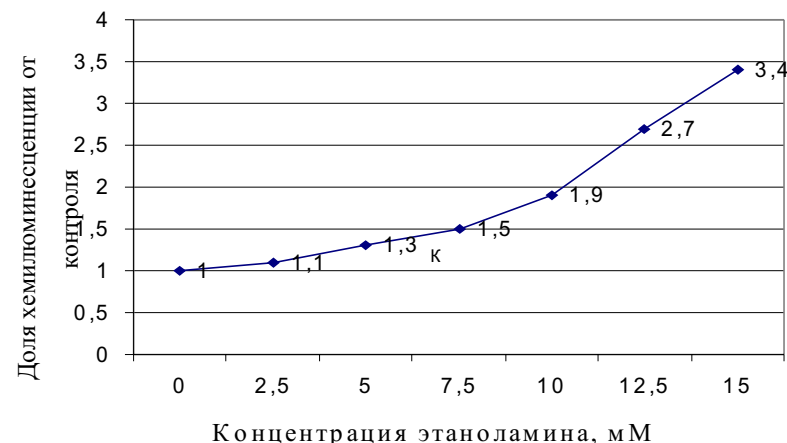


Рис. 3. Изменение хемилуминесцентного свечения системы KC-KCO в присутствии этаноламина.

Из графика (рис.4) отчетливо просматривается дозо-зависимая закономерность выхода монооксида азота при воздействии на систему ЭА.

ФЭА напротив снижал скорость реакции образования РТИ из РТИО в присутствии SIN-1 в диапазоне концентраций 0,05 – 10 мМ. Однако этот эффект не зависел от дозы препарата. Поэтому говорить о наличии у ФЭА антиоксидантной активности не представляется возможным.

#### 2.4. Определение интенсивности ПОЛ по содержанию малонового диальдегида в крови больных

При определении малонового диальдегида с помощью ТБК у больных ДЦП средние значения ( $\Sigma td = 0,90$ ) не отличались от средних значений, характерных для группы здоровых детей. Однако у 4-х из 13 обследованных значения МДА были достоверно аномальными по отношению к контролю (3,50; 1,62; 1,62; 0,60 при  $td$  соответственно 19,9; 4,25; 4,25; 4,25). Причём, у трёх из них содержание МДА существенно превышало контрольный показатель, а у больного А10, наоборот, было достоверно ниже.

По результатам нашего исследования видно, что у изученной выборки больных ДЦП изменения в уровне МДА носили неопределённый характер. У большинства больных (две трети от общего числа) содержание МДА в крови не отличалось от такового у здоровых. У одной трети больных содержание МДА достоверно превысило уровень контроля, а у одного



То же самое можно отнести и к способности ФЭА активизировать ПОЛ, он практически не усиливал выход из реакции ПОЛ малонового диальдегида (МДА), а его активность была существенно ниже аналогичной при действии ЭА. Как и в предыдущем опыте в действии ФЭА не было выявлено зависимости между концентрацией и МДА-образующим эффекте препарата.

## 2.2 Изучение супероксиддисмутазной (SOD)-активности препаратов

Для избрания диапазона концентраций предварительно провели скрининг исследования СОД-активности ЭА и ФЭА.

Скрининговые исследования ФЭА не выявили его влияния на образование супероксид-анион радикала.

При скрининге СОД-активности ЭА избрали диапазон концентраций от 0,0001 мМ до 10мМ с разницей между рабочими концентрациями – в период. Было обнаружено, что в системе ксантин-ксантиоксидаза начиная с концентрации 0,01 и выше, ЭА заметно усиливал образование супероксидного радикала. При действии ЭА на систему КС–КСО в концентрации 10 мМ отмечено самое высокое образование супероксида. Для более точного определения эффективных концентраций повторили опыт, взяв за рабочий диапазон концентраций от 2,5 до 15 мМ. Результаты опыта показали, что ЭА становится активным начиная с концентрации 5,0 мМ и выше. Из графика (рис. 3) видно, что препарат в концентрации 2,5 мМ индуцировал интенсивность свечения практически не отличное от контроля ( $t_d=0,92$ ). Однако при увеличении рабочей концентрации в 2 раза уровень хемилюминесценции существенно вырос и стал достоверно отличаться от контроля.

## 2.3. Изучение влияния препаратов на образование монооксида азота (NO•)

При изучении влияния исследуемых препаратов на образование монооксида азота в диапазоне концентраций 0,001 – 1 мМ этаноламин не влиял на продукцию NO• в системе PTIO–SIN-1. В присутствии этаноламина в концентрациях 1,25 – 10 мМ в системе PTIO–SIN наблюдали дозо-зависимое усиление скорости реакции образования PTI из PTIO в присутствии SIN-1. Причём при увеличении активной концентрации 5мМ в два раза, интенсивность выхода монооксида азота увеличилась в 2,8 раза.

Табл. 1

### Содержание эритроцитов с микроядрами у больных ДЦП в зависимости от формы заболевания и пола детей

Формы ДЦП	Всего обследовано	Число эритроцитов с микроядрами				
		в группе (M±m)	у мальчиков		у девочек	
			n	M±m	n	M±m
СД	23	0,209±0,006*	16	0,212±0,009*	7	0,201±0,008**
ДГ	23	0,213±0,007*	15	0,210±0,008*	8	0,219±0,017*
ГК	17	0,215±0,011*	11	0,201±0,014*	6	0,244±0,015*
ГП(Л)	15	0,193±0,007*	6	0,187±0,011*	9	0,198±0,009**
ГП(П)	12	0,194±0,005*	7	0,188±0,007*	5	0,201±0,006**
А-А	8	0,210±0,009*	4	0,216±0,016*	4	0,204±0,012*
Контроль	40	0,087±0,008	10	0,088±0,014	30	0,075±0,006

Примечание: 1. СД – спастическая диплегия, ДГ – двойная гемиплегия, ГК – гиперкинетическая форма, ГП(Л) – левосторонняя гемипаретическая, ГП(П) – правосторонняя гемипаретическая, А-А – атонически-астатическая; 2. \* – различия с контролем достоверны ( $p<0,001$ ), \*\* – различия с ГК достоверны ( $p<0,05$ ).

Анализ количества ЭМ в соответствии с формой заболевания и полом привел к неоднозначным результатам. У больных с различной формой заболевания средний уровень ЭМ был примерно одинаков – во всех случаях  $p>0,05$ .

Более сложной оказалась зависимость уровня ЭМ от пола ребенка. Содержание ЭМ в периферической крови в группе мальчиков и девочек с одинаковыми формами заболевания практически не отличались (во всех случаях  $p>0,05$ ). Аналогичные результаты получены и при изучении уровней ЭМ в крови мальчиков в зависимости от формы заболевания – они не были связаны. В тоже время у девочек с гиперкинетической формой ДЦП он был достоверно выше, чем при спастической диплегии ( $p<0,05$ ) и гемипаретических формах болезни ( $p<0,05$ ). Таким образом, результаты исследования однозначно показали, что у больных ДЦП не зависимо от пола и форм заболевания происходит достоверное повышение уровня микроядер в периферической крови. Мы не обнаружили существенной корреляции между исследуемыми параметрами, только в одном случае - у девочек, где частота ЭМ коррелировала с некоторыми формами заболевания. Но эта корреляция была не высокой ( $p<0,05$ ). Трудно сказать, с чем связан полученный в наших исследованиях факт отсутствия влияния

форм заболевания на тяжесть повреждения генома. Скорее всего, такие результаты зависели от малой величины выборки больных детей в группах. Возможно, что увеличение числа больных детей в группах по формам заболевания приведёт к получению иных показателей и зависимостей.

С другой стороны нельзя исключить предположение, что такая монотонность в частоте повреждения генома связана с каким-то геном-повреждающим процессом, который с одинаковой интенсивностью функционирует при различных формах ДЦП. Это может быть обусловлено этапностью в формировании НГ. Если в период раннего онтогенеза уровни повреждения генома у индивидуумов различались, то в более поздний период, после элиминации путём некроза и апоптоза клеток с высоким уровнем повреждения генома, у всех больных мутагенез стабилизировался на одном, совместимом с жизнедеятельностью организма уровнем.

## 2. Определение уровня повреждения хромосом в лимфоцитах периферической крови больных и здоровых детей.

При оценки повреждений хромосом в лимфоцитах периферической крови у всех обследованных больных регистрировалось повышенное количество перестроек по сравнению с контролем. При статистической обработке результатов исследования выявлено, что высокий уровень перестроек был достоверным не у всех детей входящих в группы, а лишь у 60-78% детей ( $p < 0,001$ ) (табл. 2). Наибольшее число детей (78%) с достоверно высоким уровнем повреждений хромосом было отмечено в группе болеющих двойной гемиплегией.

Сравнительный анализ числа перестроек хромосом у детей с различными формами заболевания, показал, что наиболее высокий уровень повреждений хромосом наблюдается у детей болеющих двойной гемиплегией. У детей этой группы уровень АХ достигал в среднем 8,24%, что достоверно выше аналогичных показателей в других группах и более чем в 3 раза выше контрольного значения. Количество выявленных повреждений хромосом при других формах заболевания было существенно ниже и находилось в диапазоне от  $6,19 \pm 0,42$  до  $6,30 \pm 0,51$  и достоверно не зависело от формы заболевания.

В этих исследованиях мы столкнулись с некоторыми фактами на которых необходимо остановиться. Прежде всего, на основании анализа aberrаций хромосом у каждого заболевшего выявлено, что повреждения хромосом возникают не у всех детей страдающих ДЦП. Причём это

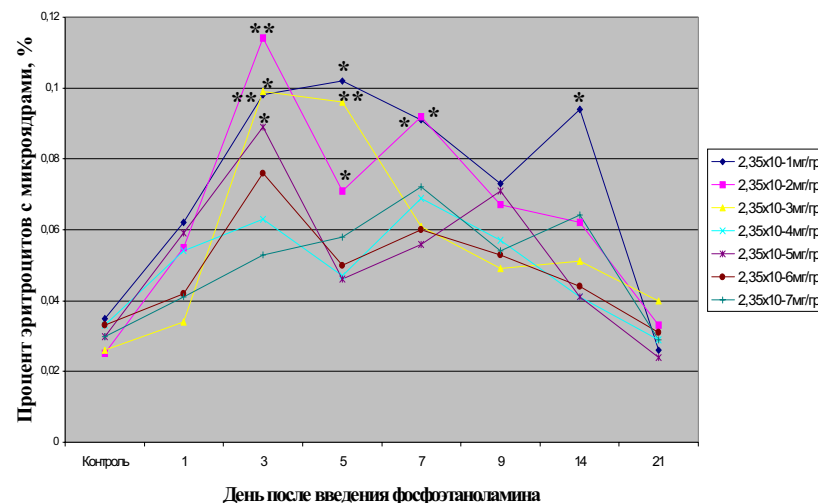


Рис.2. Уровень эритроцитов с микроядрами в клетках периферической крови мышей, индуцированных фосфозтаноламином  
Примечание: \* – различия с контролем достоверны ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ).

активен с 3 по 7 дни после введения препарата, диапазон доз также значительно уже, с  $2,35 \times 10^{-1}$  мг/г по  $10^{-3}$  мг/г, чем действие ЭА, что хорошо иллюстрируют графики на рис. 2.

## 2. Определение прооксидантной и антиоксидантной активности препаратов

### 2.1 Исследование влияние этаноламина и фосфозтаноламина на уровень липидной пероксидации в модельной системе

При исследовании про- и антиоксидантной активности установлено, что препарат этаноламин наиболее высокую способность активировать ПОЛ проявил в высоких концентрациях  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$  и  $10^{-4}$  М. Однако при этом интенсификация ПОЛ не была высокой и максимально увеличивалась всего на 9,3 – 9,7%. Эти величины свидетельствуют, прежде всего, об отсутствии способности ЭА активировать ПОЛ.

Причём эта способность характерна для очень широкого диапазона концентраций (от  $10^{-8}$  до  $10^{-2}$  М.). Учитывая это, а также то, что в полученных результатах не была обнаружена чёткая зависимость эффекта ЭА от концентрации, можно сделать предположение, что в организме активация ПОЛ не является основной в реализации НГ-образующего действия ЭА.

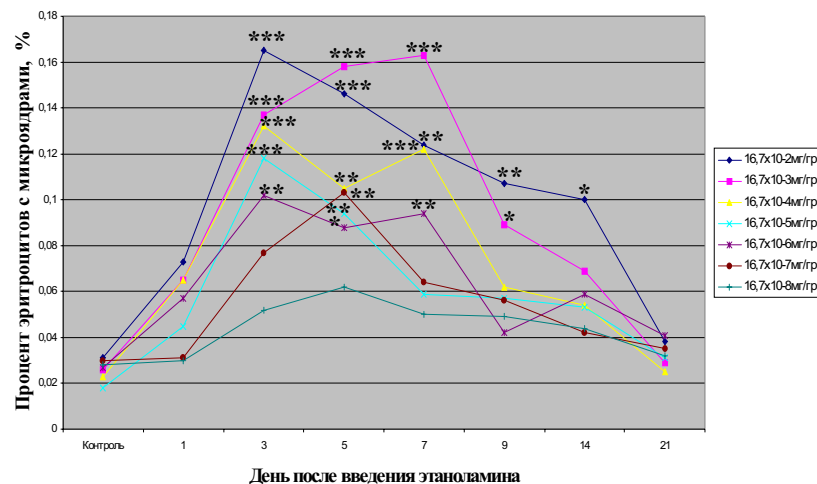


Рис.1. Уровень эритроцитов с микроядрами в клетках периферической крови мышей, индуцированных этаноламином

Примечание: различия с контролем достоверны (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

При определении анеугенной активности, индуцированной фосфэтаноломином на эритроцитах периферической крови лабораторных мышей было установлено, что ФЭА индуцировал образование эритроцитов с микроядрами, но менее интенсивно, чем ЭА. Так, в дозе  $2,35 \times 10^{-1}$  мг/г активность препарата наблюдалась на 3, 5 и 7-й дни, при этом интенсивность индуцированного действия хотя и вызывает достоверный эффект, но незначительный и ослабевает к 7 дню ( $0,098 \pm 0,023$ ;  $0,102 \pm 0,024$ ;  $0,091 \pm 0,023$  при  $td$  соответственно 2,25; 2,28; 1,99). Наиболее активным оказался ФЭА в дозе  $2,35 \times 10^{-2}$  мг/г и  $10^{-3}$  мг/г, причем наибольшее количество эритроцитов с микроядрами наблюдалось на 3-й день после введения препарата ( $0,114 \pm 0,024$  при  $td$  3,22) в дозе  $2,35 \times 10^{-2}$  мг/г, на 5 и 7-й день достоверный эффект сохранялся, но был существенно ниже. В дозе  $2,35 \times 10^{-3}$  мг/г анеугенная активность препарата индуцировалась на 3 и 5-й день ( $0,099 \pm 0,023$ ;  $0,096 \pm 0,022$  при  $td$  соответственно 2,73 и 2,72). Другие дозы хотя и вызывали достоверный эффект, но он был существенно ниже. Таким образом, подводя итог исследованию, можно констатировать, что ФЭА способен индуцировать появление эритроцитов с микроядрами, но его действие менее продолжительно во времени, то есть он наиболее

Табл.2

Уровень aberrаций хромосом у больных ДЦП  
в зависимости от формы заболевания

Формы ДЦП	Всего обследовано больных	Больные с достоверно высоким уровнем aberrаций хромосом		Средний уровень aberrаций хромосом в %	
		абс.	%	в расчете на всех обследованных больных	в расчете на больных с достоверно высоким уровнем aberrаций
				$M \pm m$	$M \pm m$
СД	10	7	70	$5,70 \pm 0,41^*$	$6,38 \pm 0,53^*$
ДГ	9	7	78	$7,63 \pm 0,51^*$	$8,24 \pm 0,59^*$
ГК	10	7	70	$5,80 \pm 0,43^*$	$6,19 \pm 0,51^*$
ГП(Л)	10	6	60	$6,00 \pm 0,43^*$	$6,39 \pm 0,58^*$
ГП(П)	10	6	60	$5,53 \pm 0,42^*$	$6,39 \pm 0,58^*$
Контроль	10	-	-	$2,63 \pm 0,93$	$2,63 \pm 0,93$

Примечание: 1. СД – спастическая диплегия, ДГ – двойная гемиплегия, ГК – гиперкинетическая форма, ГП(Л) – левосторонняя гемипаретическая, ГП(П) – правосторонняя гемипаретическая, А-А – атонически-астатическая; 2. \* – различия с контролем достоверны ( $p < 0,001$ ).

характерно для всех форм заболевания. Сразу же напрашивается вывод, который часто применяют в аналогичных ситуациях – это может быть результатом малой чувствительности используемого нами метода регистрации хромосомных aberrаций. Вполне уместно и другое объяснение – у больных детей с нормальным генотипом имеются мощные системы защиты генома, которые восстановили повреждения генетического аппарата. Примечательно то, что при анализе уровня ЭМ мы не обнаружили аналогичного явления. Это, как и в первом случае, может свидетельствовать о более чувствительной регистрации повреждений методом микроядерного анализа или объясняться разными механизмами (мутагенез и анеугенез) формирования повреждений хромосом при образовании микроядер и aberrаций. По нашему мнению оба высказанных предположения имеют право на проверку.

На втором этапе изучали механизмы формирования НГ.

# **1. Определение кластогенной и анеугенной активности этаноламина и фосфоэтанолamina в опытах на *Crepis Capillaris* и мышах.**

Перед определением кластогенной и анеугенной активности этаноламина (ЭА) и фосфоэтанолamina (ФЭА) нами проведены предварительные исследования их токсичности (торможение прорастания семян на 10 – 15%). Это необходимо для того, чтобы токсичность препарата не маскировала его мутагенных свойств.

## **1.1. Определение кластогенной активности (КА) препаратов на *Crepis capillaris***

При определении мутагенной активности этаноламина и фосфоэтанолamina было установлено, что этанолaмин достоверно выше контроля, увеличивает уровень аберраций хромосом в концентрациях от  $10^{-4}$  до  $10^{-6}$ М (см. табл. 3).

Табл. 3

**Уровень аберраций хромосом в клетках *Crepis capillaris* индуцированных этанолaмином**

Концентрация в М	Просмотрено метафаз	Перестройки хромосом		td	p
		абс. число	M±m		
$10^{-8}$	700	4	$0,57 \pm 0,28$	0,61	-
$10^{-7}$	700	9	$1,28 \pm 0,42$	0,79	-
$10^{-6}$	700	27	$3,85 \pm 0,72$	3,72	$< 0,001$
$10^{-5}$	704	26	$3,69 \pm 0,71$	3,58	$< 0,001$
$10^{-4}$	700	37	$5,28 \pm 0,84$	4,84	$< 0,001$
Контроль	703	6	$0,85 \pm 0,35$	-	-

Наиболее сильный мутагенный эффект ЭА проявил в концентрации  $10^{-4}$ М. В этой концентрации он более чем в 6 раз повысил уровень аберраций в клетках скерды относительно контроля. В концентрации  $10^{-7}$ М препарат перестал проявлять мутагенный эффект. Трудно сказать, с чем связан мутагенный эффект этаноламина. Есть данные, что этанолaмин, попадая в организм, разлагается до ацетальдегида и аммиака. Вполне возможно, что ЭА является не прямым, а косвенным мутагеном и в его геном-повреждающем эффекте задействованы продукты его метаболизма, например ацетальдегида, генотоксичность которого установлена Singh N.P., Khan A., 1995.

Табл. 4

**Уровень аберраций хромосом в клетках *Crepis capillaris* индуцированных фосфоэтанолaмином**

Концентрация в М	Просмотрено метафаз	Перестройки хромосом		td	p
		абс. число	M±m		
$10^{-8}$	701	3	$0,42 \pm 0,24$	0,98	-
$10^{-7}$	700	6	$0,85 \pm 0,34$	0,01	-
$10^{-6}$	700	7	$1,00 \pm 0,37$	0,29	-
$10^{-5}$	700	8	$1,14 \pm 0,40$	0,54	-
$10^{-4}$	700	9	$1,28 \pm 0,42$	0,79	-
$10^{-3}$	700	17	$2,42 \pm 0,58$	2,32	$< 0,05$
$10^{-2}$	700	16	$2,28 \pm 0,56$	2,16	$< 0,05$
Контроль	703	6	$0,85 \pm 0,35$	-	-

При определении кластогенной активности фосфоэтанолamina на клетках *Crepis capillaris* было установлено, что препарат также как и этанолaмин увеличивает уровень аберраций хромосом. Однако диапазон активных концентраций у ФЭА был уже и укладывался в пределы от  $10^{-2}$  до  $10^{-3}$ М (см. табл. 4).

## **1.2. Определение анеугенной активности (АА) препаратов на мышах.**

ЭА при введении его мышам индуцировал образование эритроцитов с микроядрами. Наибольшее количество ЭМ наблюдалось на 5 и 7 день после введения препарата ( $0,158 \pm 0,030$  и  $0,163 \pm 0,029$ ) (td – 4,06 и 4,27 соответственно) На 9 день активность препарата сохранялась, но была существенно ниже чем в первые дни после введения препарата ( $0,107 \pm 0,024$  и  $0,089 \pm 0,023$  при td соответственно 2,72 и 2,39). Что касается зависимости доза—эффект, то наиболее активным оказался ЭА в дозе  $16,7 \times 10^{-2}$  мг/г;  $10^{-3}$  мг/г;  $10^{-4}$  мг/г и  $10^{-5}$  мг/г. Другие дозы хотя и вызывали достоверный эффект, но он был существенно ниже.

Таким образом, можно отметить, что этанолaмин способен индуцировать появление ЭМ. Причём наибольший эффект наблюдался при высоких дозах ЭА в течение примерно 7 дней после введения препарата. Однако, небольшой (td – 2,72) мутагенный эффект у препарата наблюдался в самой высокой дозе на 14-й день после его введения, а активность препарата сохранялась на 5-й день при введении его в небольшой дозе  $16,7 \times 10^{-7}$  мг/г. Вышесказанное хорошо иллюстрируют графики на рис. 1.